昆虫碱性磷酸酶的研究进展

严　盈，彭　露，刘万学，万方浩*
（中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京　100081）

摘要： 碱性磷酸酶存在于昆虫的头、唾液腺（唾液）、肠道、马氏管、表皮、血淋巴、脂肪体、生殖系统、附肢等部位，广泛参与了昆虫的发育、神经传导、激素合成、物质代谢、滞育、社会型昆虫亚种形成等过程。同时碱性磷酸酶与昆虫抗性有关，特别涉及到对 Bt 制剂的阻滞作用，其本身也是某些农药的靶标酶，某些生物源化合物及病毒、真菌也可以影响其活性。昆虫碱性磷酸酶的研究，将有助于提高对昆虫生化机制及代谢过程的认识，并为害虫治理和资源昆虫饲养提供新的思路。本文综述了国内外对昆虫碱性磷酸酶的研究状况，并描述了昆虫碱性磷酸酶的生化性质及其与生理功能的关系。

关键词： 昆虫；碱性磷酸酶；生理功能；生化性质；代谢过程；应用前景
中图分类号： Q966　　**文献标识码：** A　　**文章编号：** 0454-6296(2009)01-95-11

Research progress in insect alkaline phosphatases

YAN Ying, PENG Lu, LIU Wan-Xue, WAN Fang-Hao* (State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: Insect alkaline phosphatases are distributed in such insect organs and tissues as head, salivary gland (saliva), intestine, Malpighian tube, cuticule, haemolymph, fat body, reproductive system and appendage. They may be involved in the process of insect development, nerve conduction, hormone synthesis, substance metabolism and diapause, and caste formation in social insects, *etc*. Alkaline phosphatases can make insect more resistant to insecticides, especially to Bt toxins. They can also be the target enzymes for some insecticides. Some biological substances can affect the enzyme activity, so can some viruses and fungi. Studies on the insect alkaline phosphatases may help the understanding of biochemical mechanism and metabolic process in insects, and also provide new ideas for pest management and the rearing of resource insects. Research progress in insect alkaline phosphatases is reviewed, and the biochemical properties of the enzymes and their relationship with physiological function are also described.

Key words: Insect; alkaline phosphatase; physiological function; biochemical properties; metabolic process; application prospects

碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP, EC. 3. 1. 3. 1）是一类非特异性磷酸水解酶，能催化磷酸单酯的水解及磷酸基团的转移反应，该酶家族高度保守，广泛存在于人、动物、植物与微生物中，在生物体内直接参与了磷酸基团的转移和代谢过程，是一类重要的调控酶。对原核生物、酵母及高等动物的研究发现，大肠杆菌 *Escherichia coli* 的 ALP 由基因 *phoA* 编码，存在于细胞周质中；酵母 ALP 由基因 *PHO8* 编码，存在于溶酶体类似物的液泡内；而哺乳动物 ALP 主要是一种糖蛋白，通过糖基化磷脂酰肌醇（GPI）锚定结合在细胞膜上（Garen and Levinthal, 1960; McComb *et al.*, 1979; Trowsdale *et al.*, 1990）。人们在哺乳动物体内共发现了 4 种 ALP 的同工酶，每一种都至少由一个基因单独编码，这 4 种同工酶中，有 3 种是组织特异的，包括胎盘（PL-ALP）、细菌细胞（GC-ALP）和肠（I-ALP）同工酶，它们之间氨基酸序列的相似性达到 90%，而第 4 种则是非组织特异的（TN-ALP），存在于肺、骨、肾等器官中，与组织特异 ALP 的氨基酸相似性为 57%，其物理和生物化学性质也存在显著差异（Harris, 1989; Manes *et al.*,

基金项目：国家重点基础研究发展规划（"973"计划）项目（2009CB119200）；"十一五"国家科技支撑计划课题（2006BAD08A17）
作者简介：严盈，男，1982 年 3 月生，重庆市南岸区人，博士研究生，E-mail: willeve_yy@yahoo.com.cn
*通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wanfangh@public3.bta.net.cn
收稿日期 Received: 2008-07-07; 接受日期 Accepted: 2008-11-11

1990)。

昆虫 ALP 的研究最早开始于 20 世纪 40 年代(Nakamura, 1940),主要采用组织化学的方法,分别在家蚕 *Bombyx mori*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、蝗虫等昆虫体内检测出 ALP,此后又在欧洲按蚊体内发现了 ALP 同工酶(Bianchi,1968)。关于昆虫 ALP 的同工酶,Eguchi(1995)曾进行过专门的论述,并比较了昆虫 ALP 与哺乳动物 ALP 之间结构和功能的差异。随着研究的深入,ALP 已经被定位于包括鳞翅目、同翅目、双翅目、膜翅目、直翅目等不同分类昆虫的不同部位,而实验手段的更新及分子生物学的快速发展,使人们对昆虫 ALP 生理功能和调控机制的认识也上升到一个前所未有的高度。在这一背景下,本文对昆虫 ALP 的研究进展包括 ALP 在昆虫体内的分布和功能、昆虫 ALP 的生化性质、外源物质对昆虫 ALP 的作用等方面进行了综述。

1 碱性磷酸酶在昆虫体内的分布和功能

1.1 头部

研究认为昆虫头部 ALP 与神经传导及社会型昆虫亚种形成有关。美洲大蠊 *Periplaneta americana* 成虫头部至少有两种 ALP 同工酶,存在于蕈形体、中心体、嗅觉神经簇以及一些独立的神经单元中,涉及的神经区域包括视神经、触觉神经、围食管神经、食管下神经等(Verhaert *et al.*, 1990), Yang 等(2000)也在黑腹果蝇成虫头部的椭圆体环状神经元中检测出 ALP,认为其对神经元反应具有特征性的功能,而这种功能可能涉及到细胞内钙离子的跨膜运输,以及神经组织中细胞的分化和增殖。Banerjee(1967)在社会型昆虫雷氏土白蚁 *Odontotermes redemanni* 的头部(及消化道)检测出一种专化的 ALP,在白蚁胚胎形成的早期,ALP 的分布和活性都很均匀,但进入幼虫期后,ALP 活性会表现出低、中、高 3 种类型,而分别具有这 3 种类型 ALP 的幼虫则各自发育为兵蚁、工蚁和有性蚁。

1.2 唾液腺(唾液)

果蝇唾液腺细胞的细胞质、核仁、染色体上均存在 ALP,且不同部位的 ALP 会产生不同的催化反应,推断果蝇唾液腺中至少存在 3 种 ALP 同工酶,负责细胞内磷酸酯键的断裂及无机磷酸盐的释放(Krugelis, 1946)。此后,在美洲大蠊和红长蝽 *Lygaeus* sp. 的唾液腺也相继检测到 ALP(Srivastava and Saxena, 1967; Kumar *et al.*, 1980),但昆虫唾液腺中存在的酶并不一定出现在唾液中,例如澳大利亚金合欢侏缘蝽 *Mictis profana* 的唾液腺中存在一种酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP, EC. 3. 1. 3. 2),但其唾液中却并无这种酶活性(Taylor and Miles, 1994),因此 Funk(2001)对 B 型烟粉虱 *Bemisia tabaci* B-biotype 的唾液腺和唾液均进行了 ALP 检测,结果证明 ALP 不仅存在于 B 型烟粉虱唾液腺中,还能通过导管分泌到唾液中,并且其活性会随着人工饲料中蔗糖浓度的降低而升高,由此推断该酶可能参与了粉虱取食时对植物韧皮部汁液中蔗糖的体外消化,而唾液腺 ALP 可能帮助了刺吸式昆虫分泌胶状唾液以形成唾液鞘(Funk, 2001)。

1.3 肠道

肠 ALP 的研究大多来自家蚕, Nakamura(1940)最早在家蚕的中肠内检测出 ALP, Sridhara 和 Bhat(1963)认为该 ALP 参与了家蚕肠道壁膜上葡萄糖和脂肪酸的运输,随后 Yoshitake 等(1966)经过电泳发现家蚕中肠至少存在两种 ALP 的同工酶:一种在电场中迁移较慢,而另一种迁移较快,进一步研究显示迁移较慢的是膜结合 ALP(m-ALP),迁移较快的是可溶性 ALP(s-ALP),且它们可能与消化液存在联系(Eguchi *et al.*, 1972a, 1972b; Eguchi, 1975, 1986),其中 m-ALP 通过 GPI 锚定在膜上,参与了柱状上皮细胞内营养物质的消化和吸收,而 s-ALP 位于杯状细胞内腔,参与离子平衡的调控(Eguehi and Yamashita, 1977; Eguchi *et al.*, 1990; Eguchi, 1995)。除家蚕外,在铜绿蝇 *Lucilia cuprina*(Wied.)若虫、金色果蝇 *Drosophila auraria*、印度竹节虫 *Carausius morosus* 和西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的肠道上皮细胞均发现较高活性的 ALP,而这些区域往往储存有丰富的糖原和油脂(Waterhouse, 1955; Waterhouse and Stay, 1955; Beadle, 1971; Dimitriadis and Kastritsis, 1985; Jimenez and Gilliam, 1990),由于哺乳动物的肠 ALP 通常与吸收糖原和油脂有关(Crane, 1960; Linscheer *et al.*, 1971),因此这些昆虫的肠 ALP 可能也具有相似的功能。此外 Yi 和 Adams(2001)还发现科罗拉多马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata*(Say)中肠 m-ALP 和 s-ALP 的转化活性与其取食活动及滞育有关。

另一方面,ALP 作为 Bt 毒剂 Cry1Ac 的阻滞蛋白分别在烟草天蛾 *Manduca sexta*(McNall and Adang, 2003)和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens*(Jurat-Fuentes and Adang, 2004)肠道内被发现,在昆虫对

Bt 毒剂抗性产生中起着重要的作用。McNall 和 Adang(2003)根据家蚕 m-ALP 制备的抗血清可以识别由烟草天蛾分离的小肠刷状缘膜囊(BBMV)中的两种 ALP：m-ALP 和 s-ALP，它们对 Cry1Ac 均具有阻滞作用，Chen 等(2005)进一步确定 m-ALP 主要存在于烟草天蛾幼虫的前肠及中肠微绒毛底部，对 Cry1Ac 的阻滞作用较强。而埃及伊蚊 *Aedes aegypti* BBMV 中 GPI 锚定的 ALP 则是 Bt 毒剂 Cry11Aa 的有效受体(Fernandez *et al.*, 2006)，由于埃及伊蚊盲囊和中肠末端的 pH 值为 8.0，中肠前端的 pH 值接近 11，所以 ALP 还可能与 GPI-碳酸酐酶一样，涉及维持昆虫肠内的碱性环境，即体内平衡(homoeostasis)。当 Bt 毒剂与 BBMV 的 ALP 结合后，均导致 ALP 活性的下降(McNall and Adang, 2003; Jurat-Fuentes and Adang, 2004; Fernandez *et al.*, 2006)，因此这可能是 Bt 毒剂的杀虫机理之一，即降低昆虫肠 ALP 的活性，扰乱其正常的生理代谢。但 ALP 活性的降低并不是 Bt 毒剂最主要的杀虫方式，因为烟芽夜蛾一个 ALP 活性只有野生型 ALP 活性 30% 的突变体，却对 Cry1Ac 毒剂更有抗性(Jurat-Fuentes and Adang, 2004)，暗示 ALP 作为 Bt 毒剂的绑定蛋白可能对昆虫具有更重要的作用。

1.4 马氏管

ALP 曾陆续在家蚕、廄刺蝇 *Stomoxys calcitrans*、非洲沙漠蝗 *Schistocerca gregaria*、紫胶蚧 *Kerria lacca*、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 等昆虫马氏管上发现(Horie, 1958; Ashrafi and Fisk, 1961; Nickerson, 1964; Gupta and Haque, 1977; Srivastava and Sharan, 1983)。最近的研究更多地来自马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata*(Say)和黑腹果蝇，发现 ALP 存在于这两种昆虫马氏管末端的细胞(Sözen *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2000)。在马铃薯叶甲体内，马氏管 ALP 比其他部位(中肠、盲肠)ALP 活性要大的多，可能与马氏管 ACP 一起涉及到消化及排泄过程中蛋白质的合成与代谢(Yi and Adams, 2001)。而在果蝇体内，当 ALP 基因 *Aph-4* 其中一个 P 元素发生突变时，会导致液体物质运输速率的降低(Yang *et al.*, 2000)，而该变化并不通过神经肽 CAP2b 或果蝇激肽(drosokinin)来起作用，因此该 ALP 可能是通过马氏管底部区域细胞活动来调节运输速率，并主要涉及液体物质的再吸收(O' Donnell and Maddrell, 1995)。对南美沙漠蝗 *Schistocerca americana* 发育研究表明上皮细胞 ALP 通过 GPI 锚定区域释放磷脂酶 C 来使其锚定到血浆膜上(Chang *et al.*, 1993)，由于果蝇马氏管由几种不同的信号途径调控，包括磷脂酶 C，因此该信号途径很可能是 ALP 控制液体物质再吸收的重要调节手段。之后，Cabrero 等(2004)进一步确定了 ALP 在双翅目昆虫马氏管近端的 10% 区域中是相当保守的。

1.5 表皮和血淋巴

地中海实蝇 *Ceratitis capitata*、果蝇、某些蟑类的表皮和血淋巴内存在 ALP(Lunan and Mitchell, 1969; Harper and Armstrong, 1974; Psarianos *et al.*, 1987; Misbahuddin and Ehteshamuddin, 2000)。地中海实蝇表皮含有两种 ALP，而血淋巴只发现了一种 ALP，该 ALP 电泳条带与表皮两个 ALP 条带均不相同，表示它是一种独立的同工酶(Psarianos *et al.*, 1987)，这 3 种 ALP 可能一起涉及到虫体体壁的骨化，作用机理与果蝇血淋巴 ALP 相似，即将酪氨酸以磷酸单氧酪氨酸的形式储存于血淋巴内(Lunan and Mitchell, 1969)，在表皮形成及身体发育过程中，ALP 水解磷酸单氧酪氨酸从而产生酪氨酸，并转化为儿茶酚胺，该儿茶酚胺参与形成骨化所必须的交叉连锁蛋白(Harper and Armstrong, 1974)。

1.6 脂肪体

沙漠蝗、甜菜夜蛾、家蚕的脂肪体都存在 ALP(George and Eapen, 1959; Sujak *et al.*, 1978; Li, 2004)，Pant 和 Jaiswal(1982)比较测定了不同光周期对滞育昆虫印度柞蚕 *Antheraea mylitta* 和非滞育昆虫蓖麻蚕 *Philosamia cynthia ricini* 脂肪体 ALP 活性的影响，发现它可能与 ACP 一起涉及到对糖原的脱磷酸化作用，从而调控昆虫的滞育时间。

1.7 生殖系统

Ashrafi 和 Fisk(1961)在廄刺蝇的输卵管、子宫腺及睾丸管上皮细胞的细胞质和核仁内检测到 ALP，紫胶蚧雌虫的性腺上也存在 ALP(Gupta and Haque, 1977)，Funk(2001)认为 B 型烟粉虱卵巢管上的 ALP 与粉虱卵壳的硬化有关。

1.8 附肢

附肢 ALP 往往涉及到组织形成和神经信号的传导。Chang 等(1993)发现 ALP 在沙漠蝗虫附肢中有大量分布，其中在足和触角上具有相当高的活性，而口器和尾毛也有分布，但活性相对较小，ALP 会严格地在腿的分节部位高度表达，同时 ALP 染色最集中的胫节和腿节，也是蝗虫腿在形态发生过程中延长最多的分节，表明它可能参与了蝗虫上皮组织的形态形成，包括翅芽外翻、分节界内陷、表皮向

翅内突等过程,而这种涉及形态改变的 ALP 也发生紫胶蚧雄虫腿上的成虫盘(imaginal disc)中(Gupta and Haque, 1977)。更重要的是,在蝗虫足的转节中,昆虫神经信号传导物质生长圆锥细胞 Ti1 的迁移非常集中,其上具有两种上皮细胞 GPI 锚定分子成束蛋白Ⅰ(fasciclin I)和 lachesin 蛋白,起着导向的作用,而 Ti1 生长圆锥细胞主要位于 ALP 细胞和非 ALP 细胞的边界处,表明 ALP 可能通过使成束蛋白Ⅰ和血影蛋白脱磷酸化,或直接作为它们的识别配体,使 Ti1 生长圆锥细胞识别传导信号,从而在发育中能够决定和诱导神经突起向靶的方向生长(Chang *et al.*, 1993)。此外,丽蝇 *Calliphora* 触角中也存在一种非专化的 ALP,可能涉及到磷酸单酯的水解,通过帮助某些有机物(例如含透明质酸的碳水化合物)向外部感受器淋巴腔的运输来使嗅觉信号得以传递(Gnatzy and Weber, 1978)。

1.9 其他部位

Funk(2001)在 B 型烟粉虱的粘腺中检测出 ALP,推断它可能有助于粘腺分泌出胶质,使粉虱的卵附着于寄主植物的叶片上,ALP 还出现在家蚕的丝腺中,可能伴随了家蚕产丝的代谢过程(Horie, 1958; Li, 2004)。此外,ALP 还在美洲大蠊的胃液和蚂蚁的毒液中被发现,但其生物学功能尚不清楚(Cook *et al.*, 1969; Schmidt *et al.*, 1986)。

2 昆虫碱性磷酸酶的生化性质

2.1 最适 pH 值

昆虫 ALP 最适 pH 值在中性至碱性之间差异较大。Eguchi 等(1986)推测由于家蚕中肠 m-ALP 处于 BBMV 表面的位置,因此它必须适应肠道消化液的强碱性环境,Okada 等(1989)证实了这一点,发现 m-ALP 和 s-ALP 的最适 pH 值分别为 10.9 和 9.8,前者在 pH 10.0~12.0 之间均有较高活性且非常稳定,同时还可以抵抗消化液中蛋白酶的作用而后者却不能(Eguchi *et al.*, 1972b; Eguchi 1975),这些都暗示了 m-ALP 对家蚕中肠内腔的生理环境具有超乎寻常的适应能力,而烟草天蛾中肠 m-ALP 也具有相同的特性(Dow, 1984),表明 m-ALP 的这种适应能力在鳞翅目昆虫体内是比较保守的。同时地中海实蝇的表皮和血淋巴 ALP 的最适 pH 值在 8.5~9.0之间(Psarianos *et al.*, 1987),Bourtzis 等(1993)发现地中海实蝇在若虫向蛹转变中的两个变异品系白蛹(wp)和黑蛹(dp)各有一个 ALP 同工酶,其最适 pH 分别为 9.4 和 11.0,故家蚕和地中海实蝇 ALP 最适 pH 值都更偏向于碱性。在 B 型烟粉虱中,其唾液 ALP 最适 pH 值出现在 10.4,同时在 7.0(植物韧皮部汁液的一般 pH 值)也有活性(Funk, 2001),但严盈等(2008)发现 B 型烟粉虱和温室白粉虱 *Trialeurodes vaporaiorum* 不同虫态的体内 ALP 最适 pH 值均为 7.8,同样的沙漠蝗中肠 ALP 最适 pH 值为 7.4(Ashrafi *et al.*, 1969),而其附肢中检测的 ALP 最适 pH 值为 6.5(Chang *et al.*, 1993),因此同种昆虫不同部位 ALP 可以具有不同的最适 pH 值。此外,厩刺蝇、跗斑库蚊 *Culex tarsalis* ALP 最适 pH 值分别为 7.3 和 8.0(Ashrafi, 1960; Houk and Hardy, 1984),这些昆虫 ALP 的最适 pH 值都更偏向中性。

2.2 最适温度

沙漠蝗、蚊子、B 型烟粉虱 ALP 的最适温度分别为 40, 37 和 47℃(Ashrafi *et al.*, 1969; Houk *et al.*, 1984;严盈等,2008),可以看出不同昆虫 ALP 的最适温度差异并不大,但其对热的稳定性却表现出物种甚至是分布部位的特异性。对果蝇进行热胁迫(38℃, 1 h, 2 h)后发现两种促性腺激素诱导的 ALP 活性都显著下降,表明果蝇 ALP 对热是极为敏感的(Rauschenbach *et al.*, 2007),而 B 型烟粉虱唾液 ALP 在最适 pH 范围对热极不稳定,而在接近中性(pH 6.5)时对热却很稳定,表明其在高温和碱性条件下更容易变性失活(Funk, 2001),严盈等(2008)发现 B 型烟粉虱和温室白粉虱不同虫态的 ALP 最适温度均为 47℃,但在 27~67℃的温度范围内 B 型烟粉虱的 ALP 活性比温室白粉虱更为稳定,认为两种粉虱 ALP 对温度稳定性的差异可能一定程度上解释了两者竞争能力的不同。此外即使是同一昆虫体内的不同 ALP 同工酶,对热的稳定性也不同,如地中海实蝇的两种 ALP 同工酶 ALP1 和 ALP2,前者对热稳定而后者对热却极不稳定(Bourtzis *et al.*, 1993)。

2.3 K_m 值

以磷酸单氧酪氨酸为底物测出地中海实蝇的表皮 ALP K_m 值为 0.4 mmol/L(Psarianos *et al.*, 1987),而对硝基苯磷酸(p-nitrophenyl phosphate, pNPP)是测定 ALP 更为常见的底物,用它测得家蚕中肠 m-ALP 和 s-ALP 的 K_m 值分别为 1.99 和 1.49 mmol/L(Okada *et al.*, 1989),厩螫蝇 *Stomoxys calcitrans* 和沙漠蝗 ALP 的 K_m 值分别为 40 和 14 mmol/L(Ashrafi, 1960; Ashrafi *et al.*, 1969)。严盈等(2008)以 pNPP

测出两种粉虱在发育过程中不同龄期 ALP 的 K_m 值会保持一定的变化，但均在伪蛹期达到最低值，表明此时 ALP 对底物亲和力最高，许多昆虫 ALP 被报道与虫体发育和骨化有关（Harper and Armstrong, 1974; Chang *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2000），而伪蛹期正是粉虱羽化成虫、体壁骨化最旺盛的时期，因此粉虱 ALP 也很可能参与了虫体的发育和骨化。

2.4　特异性抑制剂

氨基酸及其他化合物常常被用来区分不同昆虫的 ALP（Eguchi, 1995）。例如半胱氨酸（Cys）和组氨酸（His）既可以抑制 B 型烟粉虱唾液 ALP 的活性（Funk, 2001），也可以抑制果蝇和家蚕中肠 ALP 的活性（Harper and Armstrong, 1973; Okada *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1991）。酪氨酸（Tyr）能够抑制地中海实蝇的 ALP1，而不能抑制 ALP2（Bourtzis *et al.*, 1993）。同时许多昆虫 ALP 能够被 EDTA 所抑制（Yamamoto *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1993; Funk, 2001），由此反映出金属离子在昆虫 ALP 结构和活性中的作用，不同的是，B 型烟粉虱唾液 ALP 和地中海实蝇 ALP 是随着 EDTA 剂量减少而被逐渐抑制，而库蚊 ALP 是随着 EDTA 剂量加大而被逐渐抑制（Houk and Hardy, 1984; Bourtzis *et al.*, 1993; Funk, 2001）。另外左咪唑也常用来区分不同昆虫的 ALP，B 型烟粉虱唾液 ALP 在 10 mmol/L 左咪唑的条件下活性会降低 50%（Funk, 2001）。同时重金属离子 Cd^{2+}, Pb^{2+} 和脲对白蜡虫 *Ericerus pela*（Chavannes） ALP 有强烈的抑制作用（赵欣平等，2002），其中脲是 ALP 典型的蛋白质变性剂，低浓度的脲对白蜡虫碱性磷酸酶的活性抑制的动力学表现为混合型效应。

2.5　结构

多数哺乳动物 ALP 是由两个相似或相同的亚基组成的二聚体（Holmgren and Stigbrand, 1976; Komoda *et al.*, 1981），而家蚕中肠 ALP 却是一个单独的多肽结构，其中 m-ALP 约为 58 kDa，s-ALP 约为 61 kDa（Okada *et al.*, 1989），而烟草天蛾分离的 BBMV 中检测出的 m-ALP 和 s-ALP 分子量分别为 62 和 65 kDa（McNall and Adang, 2003），同时蝗虫胚胎和埃及伊蚊 BBMV 中的 ALP 分子量分别为 56.2和 65 kDa（Chang *et al.*, 1993; Fernandez *et al.*, 2006），此外地中海实蝇表皮纯化的两种 ALP 同工酶分子量分别为 18 和 90 kDa（Psachoulia *et al.*, 1989）。赵欣平等（2001）认为丝氨酸、赖氨酸和色氨酸残基是白蜡虫 ALP 的必需功能基团，部分二硫键也是酶的催化功能所必需的。另外 ALP 是一种含有镁离子和锌离子的金属酶，其结构的维持和酶活力的表现都需要金属离子（Fernley, 1971），家蚕两种 ALP 同工酶会被 EDTA 所抑制，但在加入了镁离子和锌离子后其活性会部分恢复（Yamamoto *et al.*, 1991），而对大肠杆菌产生的 ALP 晶状结构中金属结合域的鉴定研究进一步证实了镁和锌对 ALP 活性的作用（Sowadski *et al.*, 1985），同时与镁和锌连锁的保守氨基酸序列也存在于家蚕和果蝇 ALP 的 cDNA 文库中（Itoh *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000）。

3　外源物质对昆虫 ALP 的作用

3.1　农药对昆虫 ALP 的作用

ALP 被普遍认为是一种与昆虫抗性有关的水解酶。Smirnoff（1983）分别用有机磷和 Bt 毒剂处理云杉色卷蛾 *Choristoneura fumiferana*（Clemens）后，发现前者会增加虫体中 ALP 的表达量从而使昆虫产生抗性，而后者却使 ALP 表达量降低，对昆虫具有直接的毒害作用，同时棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（Hübner） ALP 对有机磷农药也具有极强的水解作用（Srinivas *et al.*, 2006），而对氰戊菊酯和氯氰菊酯具有抗性的棉铃虫若虫 ALP 活性显著高于其敏感品系（Srinivas *et al.*, 2003），此外 Ahmed 等（2004）测定了用氯氰菊酯和氟氯菊酯处理赤拟谷盗后不同时间点的 ALP 活性，发现两种药剂处理 24 h 后赤拟谷盗 ALP 活性显著增加，随后氯氰菊酯处理 ALP 保持不变而氟氯菊酯处理的 ALP 逐渐下降，显示出昆虫对药剂逐渐产生一定的适应能力，这些都表明 ALP 涉及到了昆虫对有机磷和除虫菊酯类农药抗性的产生。另一方面，ALP 也可作为某些农药的靶标酶，使昆虫受到伤害或死亡（吴秋雁，1990; Nakoniecznya, 1993）。例如磷胺就可以抑制某些蝽类的血淋巴 ALP，使蛋白合成受阻（Misbahuddin and Ehteshamuddin, 2000），而 DDT 会使香蕉假茎象甲 *Odoiporus longicollis* 的脑原神经分泌核周体（protocerebral neurosecretory perikarya）中 ALP 活性增加 34%，导致该神经分泌细胞过活跃而释放出大量的神经分泌物质，而这种神经激素的不平衡释放对昆虫而言是非常有害的，表明 DDT 对 ALP 的调控是其致死的机理之一（Tripathi, 1982）。此外某些生物源农药对昆虫 ALP 也有一定作用，如铿木三萜（*Dysoxylum* triterpenes）和蕨内酯（beddomei lactone）

等可以抑制稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée)中肠 ALP,降低其食物利用率(Nathan *et al.*, 2007),具有相同效果的还有印度楝树油柠檬苦素(neem limonoids)和川楝 *Melia azedarach* 萃取物(Nathan, 2006),表明这些植物源农药可以作用于ALP 等靶标酶来控制害虫。

3.2 激素对昆虫 ALP 的作用

由于 ALP 能水解磷酸单氧酪氨酸产生酪氨酸,并可转化为多巴胺(dopamine, DA),同时某些促性腺激素能够控制昆虫体内多巴胺的含量,因此人们猜测这些促性腺激素是通过作用 ALP 来调节多巴胺的。研究发现保幼激素(juvenile hormone, JH)可以增加马铃薯叶甲马氏管、中肠、盲肠的 s-ALP 活性及中肠、盲肠的 m-ALP 活性,马氏管 m-ALP 可以由蜕皮激素(20E)激活,而促咽侧腺体素(allatotropin)对两种 ALP 都没有激活作用(Yi and Adams, 2001)。同时 Bogomolova 等(2007)发现通过促性腺激素增加雌果蝇体内多巴胺的含量后,其 ALP 活性降低而不是增加,进一步分析发现昆虫体内的这种生物胺可以自动调节其合成酶的活性,当体内具有足够多的多巴胺时,将反作用于 ALP 活性,从而减少多巴胺的生成,Rauschenbach 等(2007)采用 JH 处理雌果蝇取得了相同的结果,但用 20E 处理雌果蝇时发现 20E 会显著增加 ALP 活性,同时显著增加DA 含量,因此 20E 是通过 ALP 来直接调控 DA 的。

3.3 核苷类物质对昆虫 ALP 的作用

有的核苷单磷酸盐物质,如 5′-单磷酸腺苷(AMP)和次黄嘌呤核苷酸(IMP)以及原钒酸钠(sodium orthovanadate),能显著抑制蝗虫胚胎 ALP 活性,而脱磷酸的腺苷和次黄苷则不具有抑制能力,可见磷酸是该类抑制剂的必须基团,这些核苷物质可能是作为 ALP 的竞争型抑制剂(竞争酶的同一个活性部位)来起到抑制作用,如同家蚕中肠的 s-ALP 具有 ATP 酶的活性(Azuma *et al.*, 1991),蝗虫胚胎 ALP 也可能起到一种核苷酸酶的作用,使胞间的核苷磷酸盐脱磷酸化(Chang *et al.*, 1993)。还有的核苷类物质如二羟丙腺苷(DHPA)可以引起昆虫的不育或卵致死效应,但并非对所有昆虫都有作用,有研究将 DHPA 加到人工饲料中喂养始红蝽 *Pyrrhocoris apterus*,发现 DHPA 会在昆虫体内发生一种内吸性的磷酸化作用,并以磷酸盐的形式被迅速排泄出体外而被无害化(Votruba *et al.*, 1985),但这种内吸形成的磷酸盐是如何通过代谢器官如马氏管、肠道的上皮细胞而没有被 ALP 水解的呢? Němec 和 Sláma(1988)发现始红蝽取食 DHPA、含天然香菇嘌呤(D-eritadenine)及其他一些开环的核苷类物质后,其体内的马氏管、肠道上皮细胞中的 ALP 活性会被显著抑制,从而降低了对磷酸盐的水解能力,最终保护了昆虫使其免受有毒代谢物的影响。

3.4 其他物质对昆虫 ALP 的作用

Eskafi 和 Norment(1976)发现棕色隐遁蜘蛛 *Loxosceles reclusa* (G&M)毒液能够诱导增强家蝇和烟芽夜蛾若虫 ALP 的活性,表明 ALP 在昆虫抵御天敌中发挥作用。病毒和真菌也能使昆虫 ALP 活性发生改变,Miao(2002)用质型多角体病毒(CPV)感染家蚕后其中肠 ALP 活性会降低而核型多角体病毒(NPV)对 ALP 活性却没有影响,这种情况也出现在甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 脂肪体和中肠内(Sujak *et al.*, 1978),该区别体现了 ALP 在中肠中的生理作用,由于 NPV 作为一种封闭的双链 DNA 分子病毒,不仅感染中肠,同时也可以感染其他组织,在其进入昆虫中肠并进行增殖的早期,DNA 复制非常迅速,耗氧量也迅速增加,而这时中肠稳定的 ALP 活力有助于提供能量,帮助病毒子向其他组织扩散,而 CPV 仅感染中肠的上皮细胞,产生大量的多角体,以致破坏细胞导致 ALP 的活力下降。同时家蚕病毒性软化病病毒可以使家蚕丝腺 ALP 急剧升高(李文楚,2004)。此外还发现苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 会对家蚕中肠组织造成直接的损伤,从而导致 ALP 活力剧烈的下降(Miao,2002),但真菌对昆虫 ALP 的影响并不绝对,Serebrov 等(2006)用真菌感染大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 后,增加其体内某些解毒酶的活性,但对 ALP 却没有影响。

4 小结和展望

早期研究认为,昆虫体内的 ALP 存在于具有合成纤维蛋白(fibrous protein)功能的细胞内,就其本质而言,ALP 对上皮细胞的运输作用在昆虫进化中是保守的。但是不同昆虫 ALP、同一昆虫不同部位 ALP 的生化性质,都存在着一定的差异,这既与虫体内存在 ALP 同工酶有关,也与采取的研究方法有关。目前常常采用 ALP 抗血清来鉴别昆虫的 ALP,这种方法并不一定可以鉴别出 ALP 的不同同工酶,如 Azuma 和 Eguchi(1989)使用抗血清法只在家蚕中测定到 m-ALP,但如果结合一些昆虫 ALP 常见的特异抑制剂,如半胱氨酸和组氨酸、左咪唑、脲等,则

可以进一步确定 ALP 同工酶的数量和种类。

模式昆虫的研究使人们对 ALP 的同工酶及调控机理有了进一步的了解。果蝇幼虫和蛹表皮 ALP 的突变体由第 3 染色体上的两个共显性等位基因控制(Beckman and Johnson, 1964),而成虫的中肠和盲肠中各发现 1 种 ALP 同工酶,其中盲肠 ALP 由第 2 染色体上的 *Aph-2* 编码(Schneiderman *et al.*, 1966),而另一个 ALP 编码基因 *Aph-1* 则位于第 3 条染色体的 46.3 ± 0.5 处(Wallis and Fox, 1968),在果蝇的发育过程中,这些组织特异的 ALP 将会彼此作用,导致各自活性发生变化(Johnson, 1966; Schneiderman *et al.*, 1966; Schneiderman, 1967)。尽管目前果蝇 ALP 基因家族的全长序列尚不清楚,但我们仍然可以通过哺乳动物的 TN-ALP 来推论其作用,并且果蝇 ALP 和蛋白磷酸酶(EC. 3.1.3.16)的编码基因位于同一染色体的 100B 区域,而另一种磷酸酶,酸性磷酸酶(ACP)也位于同一染色体的 99C5-7 区域(Chung *et al.*, 1996)。这 3 种酶一起被定义为“磷酸单酯水解酶”(International Union of Biochemistry, 1979)且位于同一染色体上形成基因簇,从而表明它们有可能源于同一个祖先基因,同时也有可能在 100B 的附近区域找到其他磷酸单酯水解酶的编码基因。另一方面,家蚕的 ALP 同工酶 m-ALP 和 s-ALP 的编码基因位于同一染色体上,这两个基因的外显子-内含子结构高度保守,唯一不同是 Alp-m 的第 2 个内含子为 Alp-s 所缺失,其序列的相似程度为 60% ~79%,其中 m-ALP 具有较高的多态性,其转译后的修饰对酶活性是否表达至关重要,酶活性的高低则受到转录水平的调控,而 s-ALP 具有 ATP 酶的活性,其酶谱多态性较低,但 s-ALP 基因经转录后会形成两个不同大小的 mRNA 片段,其长度分别为 2.0 和 2.4 kb。两种 ALP 的无义突变体均显示出表型沉默,因此认为两种 ALP 的功能并非完全独立,它们很可能在家蚕肠道中互补地发挥作用(Azuma *et al.*, 1991; Itoh *et al.*, 1991, 1999, 2003)。

总的来说,昆虫不同部位 ALP 的研究,都有待于进一步的考证和深入。例如,ALP 在双翅目昆虫马氏管底部 10% 区域的保守存在,体现了其必然对双翅目昆虫起着某种保守而至关重要的作用,而这种作用是否就是液体物质再吸收呢? 如果是,那这种再吸收的机制是怎样的,它在昆虫对食物的利用中起到了什么作用? 同样,地中海实蝇表皮和血淋巴 ALP 对体壁骨化的作用是否也存在于其他昆虫中,该作用机理能否通过检测虫体内含有可溶性的磷酸单氧酪氨酸来验证? 还有,既然有的刺吸式昆虫(粉虱)可以将 ALP 通过唾液注入到植物体内,那么它在昆虫与植物的两级关系中扮演了怎样的角色? 此外,ALP 与昆虫发育、神经传导、激素合成、物质代谢、滞育、社会型昆虫亚种形成等方面的关系,无疑都将是下一步的研究热点。

更为重要的是,昆虫 ALP 的研究具有广泛的应用前景。在害虫治理中,可以通过抑制 ALP 活性,来降低害虫对有机磷和除虫菊酯类农药产生抗性;而在我国 Bt 作物大面积种植的情况下,目标害虫体内 ALP 能够作为其对 Bt 制剂抗性大小的指示标记,降低目标害虫体内 ALP 的表达量,从而减少其对 Bt 制剂的阻滞,就可以大大增强 Bt 制剂对目标害虫的杀伤作用;同时还可以从对害虫 ALP 具有抑制作用的生物源化合物中,分离出以 ALP 为靶标酶的环境友好的害虫控制剂。另一方面,对资源昆虫家蚕而言,ALP 活性可以作为其健康和经济价值的生化指数(Miao, 2002),在晚秋季节,由于桑叶的品质下降,可以通过特定化学物质来增加家蚕 ALP 的活力,从而提高蚕茧的质量(缪云根,1988)。此外,纯化后的 ALP 还常被用于核酸、毒物学、医学研究中,为遗传工程常用工具酶,因此可以通过家蚕品种筛选,从中选出 ALP 含量较高的品种进行纯化,从而提高家蚕的经济价值。

目前,仅建立了家蚕中肠 m-ALP 和 s-ALP 的 cDNA 文库(Itoh *et al.*, 1991, 1999),随着更多的模式昆虫完成了全基因组测序,以及生物信息学的快速发展,对其他重要昆虫的 ALP 研究,可能同样需要建立其 cDNA 文库,以期在基因组和蛋白组的水平上,全面分析其结构和功能。可以看出,ALP 几乎涉及到了昆虫方方面面的生化过程和生理活动,因此随着昆虫 ALP 研究的深入,将大大提高人们对昆虫生化机制及代谢过程的认识,并为害虫治理和资源昆虫饲养,提供新的思路。

参 考 文 献(References)

Ahmed S, Saleem MA, Shahzad RK, 2004. Effect of cypermethrin (10EC) and bifenthrin (10EC) on levels of acid and alkaline phosphatases in a strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pak. Entomol.*, 26(1): 47-52.

Ashrafi SH, 1960. The Study of Phosphomonoesterases in the Stable Fly, *Stomoxys calcitrans* (L.). Ph. D. Dissertation, Graduate School, the Ohio State University, Columbus, Ohio. 21-56.

Ashrafi SH, Naqvi SNH, Qadri MAH, 1969. Alkaline phosphatase in

the digestive system of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskal). *The Ohio Journal of Science*, 69(3): 183 - 191.

Ashrafi SH, Fisk FW, 1961. Histochemical localization of phosphatases in the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) using naphthol as-phosphate. *The Ohio Journal of Science*, 1(1): 7 - 13.

Azuma M, Eguchi M, 1989. Discrete localization of distinct alkaline phosphatase isozymes in the cell surface of silkworm midgut epithelium. *J. Exp. Zool.*, 251: 108 - 112.

Azuma M, Takeda S, Yamamoto H, Endo Y, Eguchi M, 1991. Goblet cell alkaline phosphatase in silkworm midgut epithelium: Its identity and role as an ATPase. *J. Exp. Zool.*, 258: 294 - 302.

Banerjee B, 1967. Distribution of alkaline phosphatase in the castes of the termite *Odontotermes redemanni* (Wasmann) and its role in caste formation. *Insectes Sociaux*, 14(1): 51 - 56.

Beadle DJ, 1971. The localisation of alkaline phosphatase in the midgut epithelium of *Carausius morosus*. *Histochemistry and Cell Biology*, 27(4): 370 - 372.

Beckman L, Johnson FM, 1964. Variations in larval alkaline phosphatase controlled by *Aph alleles* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 49 (5): 829.

Bianchi U, 1968. Homologous alkaline phosphatases and homologous loci in two sibling species of European anopheline mosquitoes. *Nature*, 217: 382 - 383.

Bogomolova EV, Adon' eva NV, Gruntenko NE, Raushenbakh IY, 2007. Gonadotropins influence alkaline phosphatase activity in *Drosophila virilis*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 414: 134 - 136.

Bourtzis K, Marmaras VJ, Zacharopoulou A, 1993. Biochemical and genetic studies on alkaline phosphatase of *Ceratitis capitata*. *Biochem. Genet.*, 31: 409 - 424.

Cabrero P, Pollock VP, Davies SA, Dow JAT, 2004. A conserved domain of alkaline phosphatase expression in the Malpighian tubules of dipteran insects. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 3 299 - 3 305.

Chang WS, Zachow KR, Bentley D, 1993. Expression of epithelial alkaline phosphatase in segmentally iterated bands during grasshopper limb morphogenesis. *Development*, 118: 651 - 663.

Chen J, Brown MR, Hua G, Adang MJ, 2005. Comparison of the localization of *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ-endotoxins and their binding proteins in larval midgut of tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Cell Tissue Res.*, 321: 123 - 129.

Chung HJ, Shaffer C, MacIntyre R, 1996. Molecular characterization of the lysosomal acid phosphatase from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.*, 250: 635 - 646.

Cook BJ, Nelson DR, Hipps P, 1969. Esterases and phosphatases in the gastric secretion of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology*, 15(4): 581 - 586.

Crane RK, 1960. Intestinal absorption of sugars. *Physiol. Rev.*, 40: 789 - 825.

Dimitriadis VK, Kastritsis CD, 1985. Ultrastructural analysis of the midgut of *Drosophila auraria* larvae: Distribution of alkaline phosphatase, acid phosphatase, leucine aminopeptidase, and glycogen. *Cytologia*, 50: 689 - 700.

Dow JAT, 1984. Extremely high pH in biological systems: A model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.*, 246: R633 - R635.

Eguchi M, Sawaki M, Suzuki Y, 1972a. Multiple forms of midgut alkaline phosphatase in the silkworm: Separation and comparison of two isozymes. *Insect Biochem.*, 2: 167 - 174.

Eguchi M, Sawaki M, Suzuki Y, 1972b. Multiple forms of midgut alkaline phosphatase in the silkworm: New band formation and the relationship between the midgut and digestive fluid enzymes. *Insect Biochem.*, 2: 297 - 304.

Eguchi M, 1975. Alkaline phosphatase isozymes in the alimentary canal of the silkworm. In: Markert CL ed. Isozymes. I. Molecular Structure. Academic Press, New York. 315 - 332.

Eguehi M, Yamashita Y, 1977. Genetic study on alkaline phosphatases of the midgut tissue and digestive fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 46: 515 - 520.

Eguchi M, Kuriyama K, Daimon H, 1986. High alkalinity and function of proteases of digestive juice from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 55: 46 - 53.

Eguchi M, Azuma M, Yamamoto H, Takeda S, 1990. Genetically defined membrane-bound and soluble alkaline phosphatases of the silkworm: their discrete localization and properties. In: Ogita Z, Markert CL eds. Isozymes: Structure, Function and Use in Biology and Medicine. Wiley-Liss, New York. 267 - 287.

Eguchi M, 1995. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 111: 151 - 162.

Eskafi FM, Norment BR, 1976. Physiological action of *Loxosceles reclusa* (G&M) venom on insect larvae. *Toxicon*, 14(1): 7 - 13.

Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M, 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.*, 394(Pt 1): 77 - 84.

Fernley HN, 1971. Mammalian alkaline phosphatase. In: Boyer D ed. The Enzymes. Vol. I. Academic Press, New York. 417 - 444.

Funk CJ, 2001. Alkaline phosphatase activity in whitefly salivary glands and saliva. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 46: 165 - 174.

Garen A, Levinthal C, 1960. A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 38: 470 - 483.

George JC, Eapen J, 1959. Histochemical demonstration of lipase and alkaline phosphatase activity in the fat body of the desert locust. *Nature*, 183: 268.

Gnatzy W, Weber KM, 1978. Tormogen cell and receptor-lymph space in insect olfactory sensilla. *Cell Tiss. Res.*, 189: 549 - 554.

Gupta PD, Haque MS, 1977. Distribution of alkaline phosphatase in the male and female *Kerria lacca* (Kerr.). *Indian Journal of Entomology*, 38(1): 18 - 26.

Harper RA, Armstrong FB, 1973. Alkaline phosphatase of *Drosophila*

melanogaster. II. Biochemical comparison among four allelic forms. *Biochem. Genet.*, 10: 29 – 38.

Harper RA, Armstrong FB, 1974. Alkaline phosphatase of *Drosophila melanogaster*. 3. Tyrosine-O-phosphate as substrate. *Biochem. Genet.*, 11: 177 – 180.

Harris H, 1989. The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clinica Chimica Acta*, 186: 133 – 150.

Holmgren P, Stigbrand T, 1976. Purification and partial characterization of two genetic variants of placental alkaline phosphatase. *Biochem. Genet.*, 14: 777 – 789.

Horie B, 1958. The alkaline phosphatase in the midgut of silkworm, *Bombyx mori* L. *Bull. Seric. Exp. Stn.*, 15 (4): 275 – 289.

Houk EJ, Hardy JL, 1984. Alkaline phosphatases of the mosquito, *Culex tarsalis* Coquillett. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 78: 303 – 310.

International Union of Biochemistry, 1979. Enzyme Nomenclature 1978: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzymes. Academic Press, New York.

Itoh M, Takeda S, Yamamoto H, Izumi S, Tomino S, Eguchi M, 1991. Cloning and sequence analysis of membrane-bound alkaline phosphatase cDNA of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1 129: 135 – 138.

Itoh M, Kanamori Y, Takao M, Eguchi M, 1999. Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 121 – 129.

Itoh M, Inoue T, Kanamori Y, Nishida S, Yamaguchi M, 2003. Tandem duplication of alkaline phosphatase genes and polymorphism in the intergenic sequence in *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics*, 270: 114 – 120.

Jimenez DR, Gilliam M, 1990. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): Cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. *Cell Tiss. Res.*, 261(3): 431 – 443.

Johnson FM, 1966. Developmental differences of alkaline phosphatase zymograms from *Drosophila melanogaster* and *D. ananassae*. *Nature*, 212: 843 – 844.

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Eur. J. Biochem.*, 271: 3 127 – 3 135.

Komoda T, Sakagishi Y, Sekine T, 1981. Multiple forms of human intestinal alkaline phosphatase: Chemical and enzymatic properties, and circulating clearances of the fast- and slow-moving enzymes. *Clin. Chim. Acta*, 117: 167 – 187.

Krugelis EJ, 1946. Distribution and properties of intracellular alkaline phosphatases. *Biol. Bull.*, 90: 220 – 233.

Kumar D, Ray A, Ramamurty PS, 1980. Studies on the salivary glands of *Lygaeus* sp. (Lygaeidae-Heteroptera): Histological, histochemical, autoradiographic and electron microscopic investigations. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 94: 669 – 695.

Linscheer WG, Malagelada JR, Fishman WH, 1971. Diminished oleic acid absorption in man by L-phenylalanine inhibition of an intestinal phosphohydrolase. *Nature*, 281: 116 – 117.

Li WC, 2004. Studies on the activities of alkaline phosphatase and pathology of *Bombyx mori* infected with flacherie. *Journal of South China Agricultural University (Natural Science Edition)*, 25 (4): 120 – 122. [李文楚, 2004. 软化病感染家蚕的碱性磷酸酶活力测定及病理学研究. 华南农业大学学报(自然科学版), 25(4): 120 – 122]

Lunan KD, Mitchell HK, 1969. The metabolism of tyrosine-O-phosphate in *Drosophila*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 132: 450 – 456.

Manes T, Glade K, Ziomek CA, Millan JL, 1990. Genomic structure and comparision of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics*, 8: 541 – 554.

McComb RB, Bowers GN Jr, Posen S, 1979. Alkaline Phosphatase. Plenum, New York.

McNall RJ, Adang MJ, 2003. Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 999 – 1 010.

Miao YG, 1988. Study on the alkaline phosphatase in the midgut of domestic silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 14 (3): 154 – 158. [缪云根, 1988. 家蚕中肠碱性磷酸酶活性变化研究. 蚕业科学, 14 (3): 154 – 158]

Miao YG, 2002. Studies on the activity of the alkaline phosphatase in the midgut of infected silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Appl. Entomol.*, 126: 138 – 142.

Misbahuddin RS, Ehteshamuddin S, 2000. Effect of phosphamidon on the alkaline phosphatase activity in the haemolymph of sap feeding insect pests *Aspongopus janus*, *Chrysocoris stollii* and *Dysdercus cingulatus*. *Environment* and *Ecology*, 18(2): 323 – 325.

Nakamura T, 1940. The phosphorus metabolism during the growth of the animal: The behavior of various phosphates and phosphoric acid compounds of *Bombyx mori* L. during growth. *Mitt. Med. Akad. Kioto*, 28: 335 – 416.

Nakoniecznya M, 1993. Functional aspects of cadmium and selenium interactions in insect digestive tract. Enzyme studies. *Science of the Total Environment*, 134(1): 573 – 583.

Nathan SS, 2006. Efects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 84: 98 – 108.

Nathan SS, Choi MY, Paik CH, Seo HY, 2007. Food consumption, utilization, and detoxification enzyme activity of the rice leaffolder larvae after treatment with *Dysoxylum triterpenes*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 88: 260 – 267.

Němec V, Sláma K, 1988. Inhibition of phosphatase by open-chain nucleoside analogues in insects. *Experientia*, 45: 148 – 150.

Nickerson B, 1964. Distribution of alkaline phosphatase in the Malpighian tubules of the desert locust. *Nature*, 204: 499.

O'Donnell MJ, Maddrell SH, 1995. Fluid reabsorption and ion transport by the lower Malpighian tubules of adult female *Drosophila*. *J. Exp.*

Biol., 198: 1 647 – 1 653.

Okada N, Azuma M, Eguchi M, 1989. Alkaline phosphatase isozymes in the midgut of silkworm: Purification of high pH-stable microvillus and labile cytosolic enzymes. *J. Comp. Physiol. B*, 159: 123 – 130.

Pant R, Jaiswal G, 1982. Photoperiodic effect on some enzymes and metabolites in diapausing *Antheraea mylitta* pupae and *Philosamia ricini* larvae during development. *J. Biosci.*, 4(2): 175 – 182.

Psachoulia C, Bourtzis K, Marmaras VJ, 1989. Purification and characteristics of a specific alkaline phosphatase from the integument of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 11(4): 217 – 230.

Psarianos CG, Lampropoulou M, Marmaras VJ, 1987. Alkaline phosphatase in the integument of *Ceratitis capitata* developmental profile and functional properties. *Insect Biochem.*, 17 (4): 619 – 624.

Rauschenbach IY, Bogomolova EV, Gruntenko NE, Adonyeva NV, Chentsova NA, 2007. Effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on alkaline phosphatase activity in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *Journal of Insect Physiology*, 53(6): 587 – 591.

Schmidt JO, Blum MS, Overal WL, 1986. Comparative enzymology of venoms from stinging Hymenoptera. *Toxicon*, 24(9): 907 – 921.

Schneiderman H, Young WJ, Childs B, 1966. Patterns of alkaline phosphatase in developing *Drosophila*. *Science*, 151: 461 – 463.

Schneiderman H, 1967. Alkaline phosphatase relationships in *Drosophila*. *Nature*, 216: 604 – 605.

Serebrov VV, Gerber ON, Malyarchuk AA, Martemyanov VV, Alekseev AA, Glupov VV, 2006. Effect of entomopathogenic fungi on detoxification enzyme activity in greater wax moth *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) and role of detoxification enzymes in development of insect resistance to entomopathogenic fungi. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 33(6): 581 – 586.

Smirnoff WA, 1983. Residual effects of *Bacillus thuringiensis* and chemical insecticide treatments on spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clemens). *Crop Protection*, 2(2): 225 – 230.

Sowadski JM, Handschumacher MD, Murthy HM, Foster BA, Wyckoff NW, 1985. Refined structure of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* at 2.8 A resolution. *J. Mol. Biol.*, 186: 417 – 433.

Sözen HA, Armstrong JD, Yang MY, Kaiser K, Dow JA, 1997. Functional domains are specified to single-cell resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 5 207 – 5 212.

Sridhara S, Bhat JV, 1963. Alkaline and acid phosphatases of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.*, 9: 693 – 701.

Srinivas R, Udikeri SS, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K, 2003. Identification of factors responsible for insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Resistant Pest Management Newsletter*, 13 (1): 59 – 64.

Srinivas R, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K, Sherman NE, Rao J, 2006. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hysrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biochim. Biophys. Acta*, 1 760(3): 310 – 317.

Srivastava JP, Saxena SC, 1967. On the alkaline and acid phosphatase in the alimentary tract of *Periplaneta americana* L. (Blattaria: Blattidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 2: 85 – 92.

Srivastava SK, Sharan RK, 1983. Histochemical localization of alkaline phosphatase in the alimentary canal of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Source Journal of Entomological Research*, 5(2): 175 – 176.

Sujak P, Ziemnicki K, Ziemnicka J, Lipa JJ, Obuchowicz L, 1978. Acid and alkaline phosphatase activity in the fat body and midgut of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), infected with nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 31(1): 4 – 9.

Taylor GS, Miles PW, 1994. Composition and variability of the saliva of coreids in relation to phytotoxicoses and other aspects of the salivary physiology of phytophagous Heteroptera. *Entomol. Exp. Appl.*, 73: 265 – 277.

Tripathi AK, 1982. DDT-induced neurosecretory activity in *Odoiporus longicollis* Olivier. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, 28(2): 77 – 80.

Trowsdale J, Martin D, Bicknell D, Campbell I, 1990. Alkaline phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.*, 18: 178 – 180.

Verhaert PD, Walgraeve HR, Downer RG, 1990. Alkaline phosphatase activity in the brain of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Histochem. J.*, 22: 628 – 635.

Votruba I, Holy A, Rosenberg I, Slúma K, 1985. Inhibition of ovarian sah-hydrolase in *Pyrrhocoris apterus*, sterilized with (s)-9-(2,3-dihydroxypropyl) adenine. *Insect Biochem.*, 15: 631 – 634.

Waterhouse DF, 1955. Functional differentiation of the hindgut epithelium of the blowfly larva into longitudinal bands. *Aust. J. Biol. Sci.*, 8: 514 – 529.

Wallis BB, Fox AS, 1968. Genetic and developmental relationships between two alkaline phosphatases in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Genet.*, 2: 141 – 158.

Waterhouse DF, Stay B, 1955. Functional differentiation in the midgut epithelium of blowfly larvae as revealed by histochemical tests. *Aust. J. Biol. Sci.*, 8: 253 – 277.

Wu QY, 1990. Effects of diflubenzuron on phosphatase activities in the larvae of *Culex pipiens fatigans*. *Acta Entomol. Sin.*, 33(1): 71 – 76. [吴秋雁, 1990. 灭幼脲 I 号对致倦库蚊幼虫磷酸酶活力的影响. 昆虫学报, 33(1): 71 – 76]

Yamamoto H, Azuma M, Eguchi M, 1991. Further characterization of alkaline phosphatase isozymes in the silkworm midgut: Effects of amino acids and metal ions and comparison of sugar chains. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 99: 437 – 443.

Yang MY, Wang Z, MacPherson M, Dow JAT, Kaiser K, 2000. A novel *Drosophila* alkaline phosphatase specific to the ellipsoid body of the adult brain and the lower Malpighian (renal) tubule.

Genetics, 154: 285 -297.

Yan Y, Liu WX, Wan FH, 2008. Comparison of alkaline phosphatase in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) and *Trialeurodes vaporaiorum* (Homoptera: Aleyrodidae) at different developmental stages. *Acta Entomol. Sin.*, 51(1): 1 -8. [严盈, 刘万学, 万方浩, 2008. B 型烟粉虱与温室白粉虱不同虫态的碱性磷酸酶性质比较. 昆虫学报, 51(1): 1 -8]

Yi SX, Adams TS, 2001. Age- and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the intestine and malpighian tubules of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 46: 152 -163.

Yoshitake N, Eguchi M, Akiyama M, 1966. Genetic control on the alkaline phosphatase of the midgut in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 35: 1 -7.

Zhao XP, Zhang JY, Yang SZ, Liu KW, Yu D, 2001. Functional groups of alkaline phosphames from *Ericerus pela*. *Acta Entomol. Sin.*, 44 (3): 257 -262. [赵欣平, 张久源, 杨守忠, 刘克武, 喻东, 2001. 白蜡虫碱性磷酸酶功能基团的研究. 昆虫学报, 44 (3): 257 -262]

Zhao XP, Shu C, Yang F, Liu KW, Yu D, 2002. Efects of metal ions and urea on alkaline phosphatase from *Ericerus pela* (Chavannes). *Acta Entomol. Sin.*, 45 (3): 318 -322. [赵欣平, 舒畅, 杨芳, 刘克武, 喻东, 2002. 金属离子和脲对白蜡虫碱性磷酸酶的影响. 昆虫学报, 45 (3): 318 -322]

(责任编辑:赵利辉)